

論文の内容の要旨

論文題目 拡張ナノ流体デバイスを用いた単一分子ELISA
Single- or Countable-molecule ELISA
Utilizing Extended-nano Fluidic Device

氏名 太田 諒一

1. 緒言

近年、バイオや医学では分析対象の超微量化や低濃度化が進み、試料中の目的分子数として単一・可算個分子レベルの極限分析（以下、単一分子分析と表記）が求められている。例えば、単一細胞分析では、単一細胞体積(pL)かつ低濃度(pM)の条件で目的分子数は 10^0 個となる。特に、タンパク質は遺伝子発現を反映する重要な指標であるが、タンパク質には DNA や RNA と異なり目的分子の増幅法がなく、単一分子分析は困難であった。一般的に分析プロセスは、①サンプリング、②化学プロセッシング、③検出の3つの要素からなり、これらを単一分子レベルで実現することが不可欠である。これまで検出においては、レーザー蛍光法などさまざまな単一分子検出法が実現されてきたが、単一分子レベルのサンプリングや化学プロセッシングは実現していなかった。

一方、数 cm 角の基板に構築したマイクロ (10-100 μ m) ・拡張ナノ流路(10-100nm)の微小空間にサンプリング・化学プロセッシング・検出の分析プロセス全体を集積化するマイクロフレイディクスが発展してきている。当研究室では、タンパク質を選択的かつ高感度に分析できる ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) を拡張ナノ空間に集積化してきた。これまでに、拡張ナノ空間を利用すれば目的とするタンパク質分子を 100%捕捉して検出可能なことは検証されていた。しかし、偽信号 (アーチファクト) や誤差の影響が大きく、定量分析法として確立されていなかった。これは、従来モルを対象としていた ELISA に対して、拡張ナノ ELISA ではわずか単一・可算個分子レベルの非特異吸着や夾雑物によるアーチファクトや、単一分子のロスすら分析性能に大きく影響する極限的な領域であるからだと考えた。そこで本研究では、まず拡張ナノ ELISA のアーチファクトの発生原因を解明して除去し、さらに目的分子をロスすることなく検出する

(検出効率 100%) ことで、単一・可算個分子レベルの ELISA 法を確立することを目的とした。

2. 単一分子レベルのアーチファクトの原因解明と除去 (第二章)

拡張ナノ ELISA の原理を図 1 に示す。深さ 10^2 nm の拡張ナノ空間の壁面に抗体を固相化し、サンプルを導入する。抗体で目的分子を捕捉し、酸化酵素である HRP で標識された抗体を結合させ、酵素反応により発色した基質 TMB を検出する。最初にアーチファクトの要因として、①従来から知られている酵素標識抗体の非特異吸着、②その他の未知の要因、を考えた。検証実験の結果、酵素標識抗体も目的分子も導入しない条件でも 10 分子相当の大きさのアーチファクトが出ることを見出し、②が大きく影響していることを明らかにした。そこで、②の原因について、ELISA デバイス加工プロセスから ELISA 測定まで全体を考慮して候補を挙げ、絞り込む実験を提案した。その結果、デバイス加工に用いる Cr が六価になり流路表面に残留することで、酵素 (HRP) と同様の酸化活性を発現してアーチファクト (Cr アーチファクト) の原因となることを明らかにした。また、図 2 に示すように、わずか 1 個の 10^1 nm ナノ粒子に相当する量の Cr が、単一目的分子と同量の TMB を発色し、偽信号として検出されることがわかった。

通常影響しない極微量残留 Cr が単一分子 ELISA になると大きく影響することをはじめて明らかにした。そこで、Cr フリーの加工プロセスを新たに開発した結果、TMB のみ導入した場合のアーチファクトをゼロとすることに成功した。

次に、①酵素標識抗体の非特異吸着について検討した。アーチファクトの酵素標識抗体濃度依存性を評価した結果、酵素標識抗体濃度に対してアーチファクトが比例して増加することを明らかにして、酵素標識抗体濃度 0.3 nM 以下でアーチファクトをゼロにできることも見出した。

以上の検討から、拡張ナノ ELISA におけるアーチファクトの原因を解明してゼロに低減した。

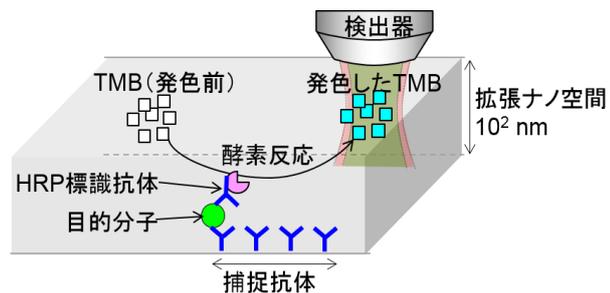


図 1 : 拡張ナノ ELISA の原理

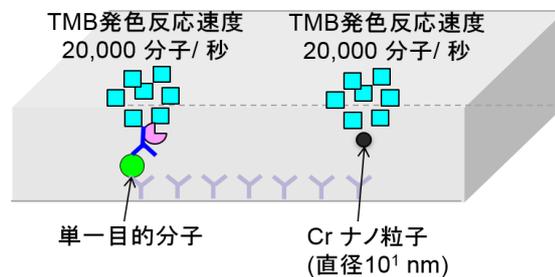


図 2 : 単一分子分析における Cr ナノ粒子の影響

3. 単一分子領域における検出効率の検証

検出効率 100%を目指し、最初に検出効率の低下要因を①捕捉抗体との反応効率、②酵素標識抗体との反応効率、③酵素標識抗体や抗原の脱離率、の3つに整理した。①に関しては、過去の研究で 100%の反応効率が実証されているため、本研究では②と③について調べた。

②や③の検討には、多数の ELISA の測定結果の比較が必要である。このとき、すべての測定を同一のデバイスで行うことで、デバイス加工に由来する誤差を排除することができる。そこで、②や③の検討に先立ち、デバイス再利用法を検討した。まず、抗体剥離によるデバイス再利用法を検討した。これは当研究室で開発された薄層 ELISA (分析場のサイズ: 幅 5 mm, 深さ 5 μm) で用いられる手法であり、ELISA の測定後にグリシン塩酸緩衝液を導入することで目的分子と酵素標識抗体を捕捉抗体から剥離・除去し、ELISA 測定前の状態へと復元する手法である。本研究ではグリシン塩酸緩衝液の pH と導入時間を検討し、1 デバイス 16 回の測定を可能とした。しかし、拡張ナノ流路の詰まりが問題となり、抗体剥離のみでは再利用回数が 20 回以下に留まっていた。そこで、ガラス基板剥離によるデバイス再利用法を着想した。デバイスを構成する 2 枚のガラス基板の剥離・洗浄・再接合を繰り返すことで、流路が閉塞して再利用が困難となったデバイスを復元できると考えた。ガラス基板の接合条件を検討し、3 度の剥離・再接合に成功した。

項目②について、酵素標識抗体濃度を変えて、CRP (目的タンパク) の検量線から感度を求めた。その結果、酵素標識抗体濃度 6 nM 以上で感度が最大、すなわち検出効率が最大となることがわかった。次に項目③について、目的分子と酵素標識抗体が結合した後の洗浄工程中に、目的分子が抗体から脱離することの影響を評価した。洗浄時間を変えて測定した結果、洗浄時間に対して検出効率が指数関数的に減少する結果を得た。脱離による目的分子のロスゼロとするためには、洗浄時間を 33 秒以下とする必要があることがわかった。①②③の検討結果から、酵素標識抗体濃度 6 nM 以上、洗浄時間 33 秒以下の条件で 100%に近い検出効率を得られることがわかった。

4. 単一・可算個分子定量法の確立

次に、前節までに得られた知見と技術を統合した ELISA 分析デバイスを設計した。前節では、脱離の影響をほぼゼロとするためには洗浄時間を 33 秒以下とする必要があることを明らかにしたが、洗浄時間を 33 秒以下に短縮する流体制御技術は未確立であった。拡張ナノ ELISA では 6 種類以上の試薬を用い、マイクロ流路を通じて拡張ナノ流路に順次導入する。そして、通常マイクロ流路を共通であるため、試薬置換にはマイクロ流路の試薬置換が不可欠となる。しかし、マイクロ流路の確実な置換にはこれまで 300 秒の置換時間が必要であり、25%以上の検出効率の低下につながっていた。そこで、6 種類の試薬を迅速に導入可能なデバイスを設計・製作した。図 3 に示すように、試薬

数と同数の6本のマイクロ流路を有するデザインであり、6種類の試薬を同時に収容可能である。6本のマイクロ流路への印加圧力を切り替えることで、分岐流路内の溶液を任意の試薬へと置換し、拡張ナノ流路へと導入する。分岐流路の体積は従来のデバイスのマイクロ流路に比べて小さく、マイクロ流路の 10^{-2} 倍の時間で溶液置換が可能である。作製されたデバイスを用いて分岐流路の置換時間を測定した結果、分岐流路は1秒で置換され、ELISAの洗浄時間を合計33秒にまで短縮できることがわかった。

この統合デバイスを用いてCRPを定量分析した結果、図4に示す検量線を得た。検出限界($S/N=2$)は2.7分子、定量限界(2σ)は30.6分子であり、単一・可算個分子レベルのタンパク質定量分析を世界で初めて実現した。以上から、拡張ナノELISAを単一・可算個分子レベルの分析法として確立した。

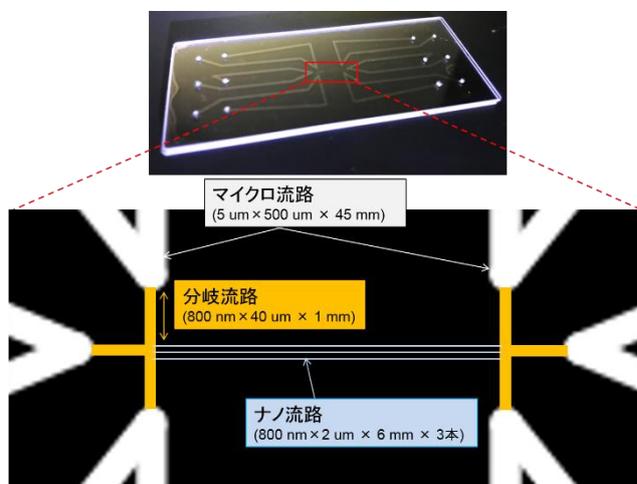


図3：デバイスの設計

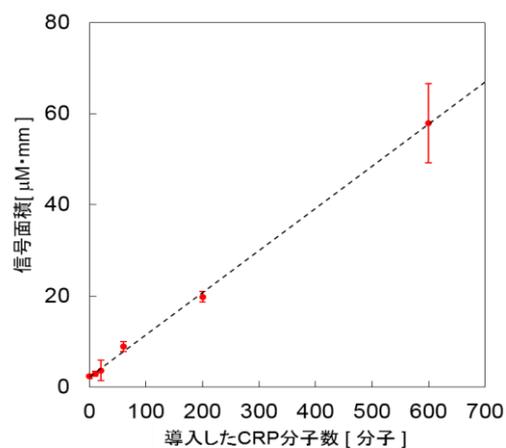


図4：CRPの検量線

5. 結言

本研究では、単一分子ELISAの方法論を確立した。まず拡張ナノELISAデバイスのアーチファクトの原因を解明し、アーチファクトをゼロにまで低減した。次に、検出効率に影響する要因を検証し、検出効率100%を満たす条件を見出した。これらの知見をもとに、ELISAデバイスを設計・作製し、単一・可算個分子領域での定量分析を実現した。本研究成果は、体積fLの試料を化学プロセッシングしてその中に含まれる可算個タンパク分子を定量する、分析化学の極限をはじめて達成した学術的に極めて重要な成果である。本手法を単一細胞タンパク分析に応用することで、発現量の小さく1細胞あたりに単一・可算個分子しか含まれないタンパク質の分析が初めて可能となり、医学・生物学の発達に大きく貢献することが期待される。